

F5

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2002年4月18日 (18.04.2002)

PCT

(10)国際公開番号
WO 02/30425 A1

(51)国際特許分類?: A61K 31/47, 31/40, 31/505, 31/22, 31/191, 31/192, A61P 43/00, 13/12, 25/00, 27/02, 9/00, 3/10, C07D 215/14, 239/42, 207/416

千葉市中央区東本町8-10 Chiba (JP). 竹本 稔 (TAKEMOTO, Minoru) [JP/JP]; 〒010-0966 秋田県秋田市高陽青柳町14-2 Akita (JP). 玉木太郎 (TAMAKI, Taro) [JP/JP]; 〒158-0094 東京都世田谷区玉川4-38-7 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP01/08921

(74)代理人: 郁 経夫, 外 (HANABUSA, Tsuneo et al.); 〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台1丁目6番地 お茶の水スクエアB館 郁特許事務所内 Tokyo (JP).

(22)国際出願日: 2001年10月11日 (11.10.2001)

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25)国際出願の言語: 日本語

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26)国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 国際調査報告書(30)優先権データ:
特願 2000-311960

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

2000年10月12日 (12.10.2000) JP

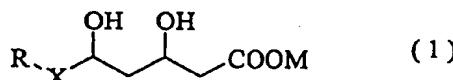
(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 日産化学工業株式会社 (NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒101-0054 東京都千代田区神田錦町3丁目7番地1 Tokyo (JP). 興和株式会社 (KOWA COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒460-8625 愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号 Aichi (JP).

(72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 北原真樹 (KITA-HARA, Masaki) [JP/JP]; 〒349-0218 埼玉県南埼玉郡白岡町大字白岡1470 日産化学工業株式会社 生物科学研究所内 Saitama (JP). 斎藤 康 (SAITO, Yasushi) [JP/JP]; 〒260-0853 千葉県千葉市中央区葛城2-4-22 Chiba (JP). 森聖二郎 (MORI, Seijiro) [JP/JP]; 〒260-0004 千葉県

(54) Title: PREVENTIVES AND REMEDIES FOR COMPLICATIONS OF DIABETES

A1

(54)発明の名称: 糖尿病合併症予防・治療剤



ful in preventing and treating complications of diabetes such as diabetic nephropathy, diabetic neuropathy, diabetic retinopathy and diabetic angiopathy.

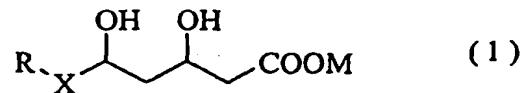
(57) Abstract: Preventives and remedies for complications of diabetes which contain as the active ingredients compounds represented by the following general formula (1) or lactone derivatives thereof: (1) wherein R represents an organic group; X represents CH_2CH_2- or $\text{CH}=\text{CH}-$; and M represents hydrogen, C_{1-10} alkyl or a physiologically acceptable cationic group. These drugs are use-特許庁のものと/or
統葉有

WO 02/30425



(57) 要約:

本発明は、糖尿病性腎症、糖尿病性神経症、糖尿病性網膜症、糖尿病性血管障害等の糖尿病合併症の予防、治療に有用な医薬品であって、式(1)



(式中、Rは有機基を示し、Xは $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ または $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示し、Mは水素原子、 C_{1-10} アルキル基または生理学的に許容し得るカチオン基を示す)

で表される化合物またはそのラクトン体を有効成分とする糖尿病合併症予防・治療剤に関する。

明細書

糖尿病合併症予防・治療剤技術分野

本発明は、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-C₆A (HMG-C₆A) 還元酵素阻害作用を有する化合物を有効成分として含有する糖尿病合併症の予防・治療剤に関する。特に糖尿病性腎症、糖尿病性神経症、糖尿病性網膜症および糖尿病性血管障害の発症、進展を予防・治療する薬剤に関する。

背景技術

糖尿病は、糖尿病性腎症、糖尿病性神経症、糖尿病性網膜症や糖尿病性血管障害などの合併症を併発することが知られており、その予防・治療には厳重な血糖コントロールが必要とされている。これらの合併症では、組織の線維化や石灰化が見られている。高血糖状態では、細胞機能のモデュレーターである糖化蛋白を産生したり、細胞内ポリオール経路を活性化しソルビトール蓄積を来たしたり、細胞内プロテインキナーゼC (PKC) を活性化し、腎糸球体細胞、神経細胞あるいは血管内皮細胞機能の異常を来たし、細胞外マトリックス蓄積や石灰化を誘導する。

糖尿病で発現が亢進する細胞外マトリックスとしては、IV型コラーゲンやフィブロネクチンが知られているが (Cagliero E. et al. : J. Clin. Invest., 82, 735-738 (1988)、Haneda M. et al. : Diabetologia, 34, 198-200 (1991)、Doi T. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 2873-2877 (1992))、最近、オステオポンチン発現が糖尿病状態の腎臓および血管で著しく亢進し、該オステオポンチン発現亢進が糖尿病性腎症あるいは糖尿病性血管障害に関与することが新たに報告された (Takemoto M. et al. : Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 20, 624-628 (2000)、Takemoto M. et al. : Ann. NY Acad. Sci., 902, 357-363 (2000))。これらのことから、糖尿病状態の腎臓あるいは血管で亢進する細胞外

マトリックスであるオステオポンチン発現を抑制することが、糖尿病性腎症あるいは糖尿病性血管障害の発症あるいは進展に予防的に作用し得ることが期待される。

現在、糖尿病性腎症、糖尿病性神経症、糖尿病性網膜症、糖尿病性血管障害等の糖尿病合併症を予防・治療し得る薬剤であってオステオポンチンをはじめとする細胞外マトリックスの発現および産生等の組織病変の本質を調節する医薬品は見出されておらず、優れた糖尿病合併症治療効果を有する医薬品が望まれている。

ところで、これまでにHMG-C₀A還元酵素阻害作用を有する化合物は、コレステロール合成阻害作用以外に、細胞増殖抑制、細胞接着抑制、内膜肥厚抑制、骨粗鬆症の予防、治療等の作用が知られている。また、頸動脈における内皮損傷誘発新生内膜の内膜肥厚部でのフィブロネクチンの蓄積を抑制することが報告されている (Kitahara M. et al.: Jpn. J. Pharmacol., 77, 117-128 (1998))。

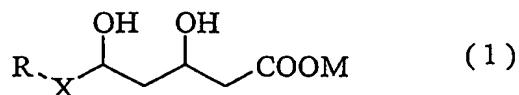
しかし、オステオポンチン発現に対する作用については知られていなかった。

本発明の目的は、糖尿病状態での腎臓あるいは血管において、オステオポンチン発現を抑制することにより糖尿病性腎症、糖尿病性神経症、糖尿病性網膜症、糖尿病性血管障害等の糖尿病合併症を予防・治療し得る薬剤を提供することにある。

発明の開示

上記実状に鑑み、本発明者等は、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットに (+) - ビス { (3R, 5S, 6E) - 7 - [2-シクロプロピル - 4 - (4-フルオロフェニル) - 3 - キノリル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸} 一カルシウム (以下、ピタバスタチンカルシウムと表記する) をはじめとする式 (1) で表される化合物であるHMG-C₀A還元酵素阻害剤を投与し、腎臓および血管でのオステオポンチンmRNA発現量への影響を詳細に検討した。その結果、式 (1) で表される化合物またはそのラクトン体が、顕著なオステオポンチンmRNA発現抑制効果を示すことから、糖尿病合併症の予防・治療剤として有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、式(1)



(式中、Rは有機基を示し、Xは $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ または $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示し、Mは水素原子、 C_{1-10} アルキル基または生理学的に許容し得るカチオン基を示す)

で表される化合物またはそのラクトン体を有効成分とする糖尿病合併症予防・治療剤を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1 (a) は、正常グルコース濃度下で培養したラット大動脈平滑筋細胞における培養上清へのオステオポンチン蛋白分泌に及ぼすピタバスタチンカルシウムの効果を示す棒グラフであり、また図1 (b) は、正常グルコース濃度下で培養したラット大動脈平滑筋細胞における培養上清へのオステオポンチン蛋白分泌量に及ぼすアトルバスタチンの効果を示す棒グラフである。

図2 (a) は、正常グルコース濃度下で培養したラット大動脈平滑筋細胞における細胞内オステオポンチンmRNA発現のピタバスタチンカルシウムによる抑制作用に対するメバロン酸添加効果を示す棒グラフであり、また図2 (b) は、正常グルコース濃度下で培養したラット大動脈平滑筋細胞における培養上清へのオステオポンチン蛋白分泌のピタバスタチンカルシウムによる抑制作用に対するメバロン酸添加効果を示す棒グラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

式(1)で表される化合物またはそのラクトン体は、HMG-CoA還元酵素阻害剤として知られている化合物であるが、これらの化合物がオステオポンチン

発現を抑制し糖尿病合併症治療に有用な薬剤であるか否かについては全く知られていない。

これらの式 (1) で表される化合物またはそのラクトン体は、例えば米国特許第4, 739, 073号およびヨーロッパ特許第114, 027号；ヨーロッパ特許出願公開第367, 895号；米国特許第5, 001, 255号、第4, 613, 610号、第4, 851, 427号、第4, 755, 606号および第4, 808, 607号、第4, 751, 235号、第4, 939, 159号、第4, 822, 799号、第4, 804, 679号、第4, 876, 280号、第4, 829, 081号、第4, 927, 851号、第4, 588, 715号；およびF. G. Kathawala, *Medical Research Reviews*, 11, 121-146 (1991)、また、ヨーロッパ特許出願公開第304, 063号、第330, 057号および米国特許第5, 026, 708号および第4, 868, 185号；ヨーロッパ特許出願公開第324, 347号；ヨーロッパ特許出願公開第300, 278号；米国特許第5, 013, 749号、第5, 872, 130号および第5, 856, 336号、米国特許第4, 231, 938号、米国特許第4, 444, 784号、米国特許第4, 346, 227号、米国特許第5, 354, 772号、米国特許第5, 273, 995号、米国特許第5, 177, 080号、米国特許第3, 983, 140号、日本国特許第2, 648, 897号、米国特許第5, 260, 440号あるいは *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5, pp437, (1977) および日本国特許第2, 569, 746号、ヨーロッパ特許第304, 063号あるいは米国特許第5, 856, 336号に記載されている。

特に、米国特許第4, 231, 938号にはロバスタチンが、米国特許第4, 444, 784号にはシンバスタチンが、米国特許第4, 346, 227号にはプラバスタチンが、米国特許第5, 354, 772号にはフルバスタチンが、米国特許第5, 273, 995号にはアトルバスタチンが、米国特許第5, 177, 080号にはセリバスタチンが、米国特許第3, 983, 140にはメバスタチンが、また日本国特許第2, 648, 897号、米国特許第5, 260, 440号あるいは *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5, pp437, (1977) にはロスバ

スタチン、即ちモノカルシウム ビス (+) - 7 - [4 - (4-フルオロフェニル) - 6 - イソプロピル - 2 - (N-メチル - N-メタンスルフォニルアミノピリミジン) - 5 - イル] - (3R, 5S) - ジヒドロキシー (E) - 6 - ヘプテノエートが記載されている。同様にピタバスタチンカルシウムは、日本国特許第2,569,746号、ヨーロッパ特許第304,063号あるいは米国特許第5,856,336号に記載されている。

上記式 (1) 中、Rで示される有機基としては、インドリル、インデニル、ピリジル、ピロロピリジル、ピラゾロピリジル、チエノピリジル、ピリミジニル、ピラゾリル、ピロリル、イミダゾリル、インドリジニル、キノリル、ナフチル、ヘキサヒドロナフチル、シクロヘキシル、フェニルシリルフェニル、フェニルチエニルおよびフェニルフリルから選ばれる環構造を含む基が好ましい。これらの環状有機基の中でも特に、ヘキサヒドロナフチル、インドリル、ピリジル、ピリミジニル、ピロリルおよびキノリルがより好ましい。これらの環構造は、ヒドロキシ基、C₁₋₁₀アルキル基 (直鎖、分岐鎖、環状を含む)、アルキルオキシアルキル基、アルキルカルボニルオキシ基、置換アミノ基、置換スルファモイル基、ハロフェニル基、フェニル基等の置換基を有していてもよく、特にイソプロピル基、シクロプロピル基およびp-フルオロフェニル基を有するものがより好ましい。これらの式 (1) で表される化合物の生理学的に許容し得る塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、フェネチルアミン塩等の有機アミン塩およびアンモニウム塩が選ばれるが、中でもナトリウム塩およびカルシウム塩がより好ましい。

さらに、上記化合物の中でも、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチン、アトルバスタチン、ロスバスタチンおよびピタバスタチンカルシウムで示されるHMG-C₆A還元酵素阻害作用を有する化合物が選ばれる。このうちピタバスタチンカルシウムが特に好ましい。

これらの式 (1) で表される化合物は、後記実施例で示すように、STZ誘発糖尿病ラットの腎臓および血管でのオステオポンチン遺伝子発現およびラット培養血管平滑筋細胞でのオステオポンチン遺伝子発現を有意に抑制する。従って、

これらの式（1）で表される化合物またはそのラクトン体は、オステオポンチン発現抑制により糖尿病性腎症、糖尿病性神経症、糖尿病性網膜症、糖尿病性血管障害等の糖尿病合併症の予防・治療に有用である。本発明の化合物を用いることにより、糖尿病に起因するオステオポンチン過剰発現による合併症の予防および治療が可能となるだけでなく、オステオポンチン遺伝子発現に関する新規な実験系の開発や新規な医薬のスクリーニング等が可能となる。

本発明の化合物を医薬として用いる場合の投与形態としては、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などによる経口投与または静脈内注射、筋肉注射剤、経皮吸収剤、挫剤、吸入剤、点眼剤、点鼻剤などの非経口投与が挙げられる。また、このような種々の剤型の医薬製剤を調製するには、この有効成分を単独で、または他の薬学的に許容される賦形剤、結合剤、增量剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、嬌味剤、香料、被膜剤、担体、希釈剤等を適宜組み合わせて用いる。

これらの投与形態のうち、好ましい形態は経口投与であり、経口投与用製剤にあたっては、有効成分の安定性を考慮して、例えば特開平2-6406号、特許第2,774,037号、WO97/23200に記載される方法でpHを調製して調製するのが好ましい。

本発明の医薬用途としての投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状等によつて異なるが、通常成人の場合、式（1）で表される化合物として、1日0.01～100mg、特に0.1～10mgを、1日1回または2回投与するのが好ましい。

実施例

次に実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は本実施例にのみ限定されるものではない。

実施例1：ストレプトゾトシン（STZ）誘発糖尿病ラットにおける腎臓および血管オステオポンチンmRNA発現の抑制

S T Z 誘発糖尿病ラットにおける腎臓および血管オステオポンチンmRNA発現に対するピタバスタチンカルシウムの作用を下記の方法で測定した。

即ち、ウィスター系雄ラット（体重：約300g）に、生理食塩水に50mg/mLの濃度で溶解したSTZを尾静脈より体重1kgあたり35mg注入し、その約1時間後に被検薬（ピタバスタチンカルシウム）の0.5%カルボキシメチルセルロース溶液（3mg/mL）を体重1kgあたり1mL（3mg/kg）で胃ゾンデを用いて強制経口投与した。その後、1日1回定刻に同量の薬液を強制経口投与した。対照群には、同量の0.5%カルボキシメチルセルロースのみを強制経口投与した。試験2日目に、尾静脈より採血し血糖値が200mg/dL以上であることを確認した。

7日間投与の24時間後に、エーテル麻酔下にて採血し、腎臓および胸部大動脈を摘出した。一定量の組織片をISOGEN（和光純薬社製）中にてポリトロンホモジナイザーを用いて破碎しtotal RNAを抽出した。得られたtotal RNAはイソプロパノールを用いて沈殿させた。この沈殿物を氷冷した70%エタノールで洗浄し、70%エタノール中にて-80°Cで保存した。

得られたtotal RNAを用いて、定法に従うノーザンブロッティングを用いた方法にてオステオポンチンmRNAを検出した。即ち、70%エタノールで沈殿させたtotal RNAを15000回転にて遠心沈降させ、上清を除去した後室温にて乾燥させ、少量のTE緩衝液（10mMトリス塩酸緩衝-1mM・EDTA液）に溶解した。得られた溶液の10μLを990μLのTE緩衝液で希釈し、溶液の260nm紫外光の吸光度を測定することによりRNA量を算出した。一定量（10または20μg）のtotal RNA（最終容量：6μL）に脱イオン化したグリオキサーの40%水溶液（3.5μL）、0.1MのNaHPO₄緩衝液（2.4μL）およびジメチルスルホキシド（11.8μL）を添加し、50°Cで1時間加温しtotal RNAを変性させた。室温に冷却した後、この溶液に50%グリセロールと0.4%プロムフェノールブルーを含有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH：6.8）を6.3μL添加し、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動した。定法に従い、20×標準

食塩-クエン酸緩衝液 (S S C) を用いてアガロースゲルからナイロン膜にRNAをプロッティングした。ナイロン膜を2×SSCで洗浄後、真空下で80°Cに加温しRNAをナイロン膜に固定化した。pCRII rOPベクターからオステオポンチン部分DNA断片をEco R-I制限酵素で切り出し、ProbeQuantTMG-50 Micro Columns (Amersham Pharmacia Biotech社製) にて精製した。得られたオステオポンチン部分DNA断片を、rediprimTMII (Amersham Pharmacia Biotech社製) で³²P標識したプローブを用い、ナイロン膜と65°Cにて一晩ハイブリダイゼーションさせた。X線フィルムによりナイロン膜に結合したプローブの放射能を検出し、NIH imageを用いてそのバンド強度を計測した。内因性コントロールRNAとして18S tRNA (18S) を用い、そのバンド強度比により発現量を換算した。オステオポンチンmRNAを正常ラット実験において同様に測定した。

実施例1の結果を表1に示す。

表1において、OPNmRNA/18SはNIH imageによる計測に基づくオステオポンチンmRNAバンド強度と18S tRNAバンド強度との比を表し、また%阻害率は各々の対照群からの阻害率を表す。OPNmRNA/18Sの値は、動物3例の平均±標準偏差を表す。

表1

	腎臓		大動脈	
	OPNmRNA/18S	%阻害率	OPNmRNA/18S	%阻害率
正常対照群	1.343±0.462		2.400±1.345	
正常薬物投与群	1.667±0.321	-24.1	2.433±0.929	-1.4
糖尿病対照群	3.233±0.115		3.200±0.361	
糖尿病薬物投与群	1.933±0.874*	40.2	1.300±0.781**	59.4

* : 対照群との有意差の危険率 ; $p=0.016$

** : 対照群との有意差の危険率 ; $p=0.036$

OPN : オステオポンチン

腎臓および大動脈でのオステオポンチンmRNAの18S比は、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおいて各々1.343から3.233および2.400から3.200に上昇した。ピタバスタチンカルシウムは、正常ラットの腎臓および大動脈でのオステオポンチン発現（各々1.667および2.433）には影響を及ぼさないが、STZ誘発糖尿病ラットでの腎臓および大動脈でのオステオポンチンmRNA発現量を各々1.933（阻害率：40.2%）および1.300（阻害率：59.4%）へと有意に低下させた。

実施例2：ラット大動脈平滑筋細胞におけるオステオポンチン蛋白分泌の抑制

正常グルコース濃度下で培養したラット大動脈平滑筋細胞における培養上清へのオステオポンチン蛋白分泌に対するピタバスタチンカルシウムおよびアトルバスタチンの作用を下記の方法で測定した。

先ず、ラット大動脈平滑筋細胞（5～10継代）を6穴培養プレートに蒔き、10%牛胎児血清（FBS : BioWhittaker 社製）含有低グルコース（1000mg/L）ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）にて5%CO₂、37°C雰囲気下にて培養しコンフルエントにした。その後、被検薬（ピタバスタチンカル

シウムおよびアトルバスタチン）を添加した同培地に置き換え48時間培養した。1穴あたり1.5mLのFBS非含有の同培地に置き換えさらに48時間培養し培養上清を回収した。その一定量（0.5～1mL）に等量の0.14M食塩、50mMトリス塩酸緩衝液（pH7.4）を添加し、同緩衝液で膨潤平衡化し50%濃度で懸濁した陰イオン交換DEAEセルロース；DE52（Whatman社製）を50μL添加し、1時間4°Cにて穏和に搅拌し、オステオポンチン蛋白をDE52に吸着させた。

遠心後、沈降したDE52ゲルを同緩衝液にて数回洗浄し、その後5%の2-メルカプトエタノール、4%のSDS、5mMのEDTA、20%のグリセロールおよび0.01%のプロムフェノールブルーを含有する0.2Mトリス塩酸緩衝液（pH6.8）を60μL添加し、5分間95°Cにて加熱処理した。室温に冷却後、遠心し、その上清の一定量（30μL）を10%SDSポリアクリラミドゲル電気泳動に供した。泳動後、定法に従い泳動蛋白をニトロセルロース膜に転写し、定法に従うウェスタンプロッティングを行った。即ち、ニトロセルロース膜を3%牛血清アルブミン含有TBS-T（0.2%Tween-20含有トリス緩衝生理食塩水）中にて1時間以上振騰した後、同溶液にて1/1000に希釈した抗オステオポンチン抗体（MP III B 10₁；American Research Products社製）溶液中で1時間振騰した。さらに3%牛血清アルブミン含有TBS-Tにて1/5000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG抗体溶液中にて1時間振騰した後、TBS-Tで数回洗浄した。ECLTM（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いた化学発光をX線フィルムにて検出した。バンドの強度をNIH imageにて計測した。

上記の測定をピタバスタチンカルシウムについては0（対照）、0.03および0.3μMの濃度、またアトルバスタチンについては0（対照）、0.3および3μMの濃度でそれぞれ行った。

実施例2の結果を図1に示す。

図1（a）は、様々なピタバスタチンカルシウム濃度でのNIH imageにて計測したオステオポンチン蛋白のバンド強度を表し、図1（b）は、様々な

アトルバスタチン濃度でのN I H *image*にて計測したオステオポンチン蛋白のバンド強度を表す。

図1から明らかなように、ピタバスタチンカルシウムおよびアトルバスタチンは共にラット培養大動脈平滑筋細胞による培養上清へのオステオポンチン蛋白の分泌量を有意に低下させた。

実施例3：ラット大動脈平滑筋細胞におけるオステオポンチンmRNA発現およびオステオポンチン蛋白分泌の抑制についてのメバロン酸の作用

正常グルコース濃度下で培養したラット大動脈平滑筋細胞中でのオステオポンチンmRNA発現および培養上清へのオステオポンチン蛋白分泌のピタバスタチンカルシウムによる抑制に対するメバロン酸の作用を下記の方法で測定した。

ラット大動脈平滑筋細胞（5～10継代）を6穴培養プレートに蒔き、10% FBS含有低グルコース（1000mg/L）DMEMにて5%CO₂、37℃ 霧囲気下にて培養しコンフルエントにした。その後、ピタバスタチンカルシウム（8μM）および／またはメバロン酸（100μM）を添加した同培地に置き換え48時間培養した。1穴あたり1.5mLのFBS非含有の同培地に置き換えさらに48時間培養した。

培養後、培養プレートに付着した細胞をISogenと共にホモジナイズし、実施例1と同様にRNAを抽出し、ノーザンプロッティングによりオステオポンチンmRNA量を測定した。

また、培養上清を回収し、オステオポンチン蛋白をDE52に吸着させ、実施例2と同様に電気泳動に供し、ウェスタンプロッティングによりオステオポンチン蛋白分泌量を測定した。

上記の測定を、ピタバスタチンカルシウムおよびメバロン酸を添加しない場合、ピタバスタチンカルシウムのみを添加した場合、およびピタバスタチンカルシウムおよびメバロン酸の双方を添加した場合について行った。

実施例3の結果を図2に示す。

図2(a)は、上記の三つの場合における、N I H *image*による計測に

基づくオステオポンチンmRNAバンド強度と18S tRNAバンド強度との比を表し、また図2 (b) は、上記の三つの場合における、NIH imageにて計測したオステオポンチン蛋白のバンド強度を表す。

図2から、ピタバスタチンカルシウムはラット培養平滑筋細胞のオステオポンチンmRNA発現およびオステオポンチン蛋白分泌を抑制するけれども、これらのピタバスタチンカルシウムの抑制作用はメバロン酸の添加により消失することが判明した。このことから、ピタバスタチンカルシウムを添加してメバロン酸の産生を阻害することにより、大動脈平滑筋細胞におけるオステオポンチンのmRNA発現および蛋白分泌が抑制されると推測される。

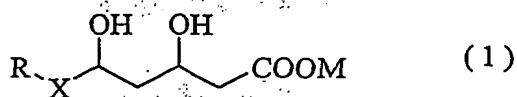
産業上の利用可能性

本発明の式(1)で表される化合物は、正常状態でのオステオポンチン発現に影響を及ぼすことなく、糖尿病状態の腎臓および大動脈での亢進したオステオポンチン発現に対して特異的かつ有効な抑制作用を示し、糖尿病でのこれらの臓器でのオステオポンチン産生を顕著に抑制する。

従って、式(1)で表される化合物は、特に糖尿病性腎症、糖尿病性神経症、糖尿病性網膜症および糖尿病性血管障害等のオステオポンチン発現の亢進に関与する糖尿病合併症の予防・治療剤として有用である。

請求の範囲

1. 式 (1)



(式中、Rは有機基を示し、Xは $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ または $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示し、Mは水素原子、 C_{1-10} アルキル基または生理学的に許容し得るカチオン基を示す)

で表される化合物またはそのラクトン体を有効成分とする糖尿病合併症予防・治療剤。

2. Rがインドリル、インデニル、ピリジル、ピロロピリジル、ピラゾロピリジル、チエノピリジル、ピリミジニル、ピラゾリル、ピロリル、イミダゾリル、インドリジニル、キノリル、ナフチル、ヘキサヒドロナフチル、シクロヘキシル、フェニルシリルフェニル、フェニルチエニルおよびフェニルフリルから選ばれる環構造を含む基である、請求項1記載の糖尿病合併症予防・治療剤。

3. 式(1)で表される化合物が、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチン、アトルバスタチン、ロスバスタチンまたは(+)-ビス{((3R, 5S, 6E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-3-キノリル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸}カルシウムである、請求項2記載の糖尿病合併症予防・治療剤。

4. 式(1)で表される化合物が、(+)-ビス{((3R, 5S, 6E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-3-キノリル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸}カルシウムである、請求項3記載の糖尿病合併症予防・治療剤。

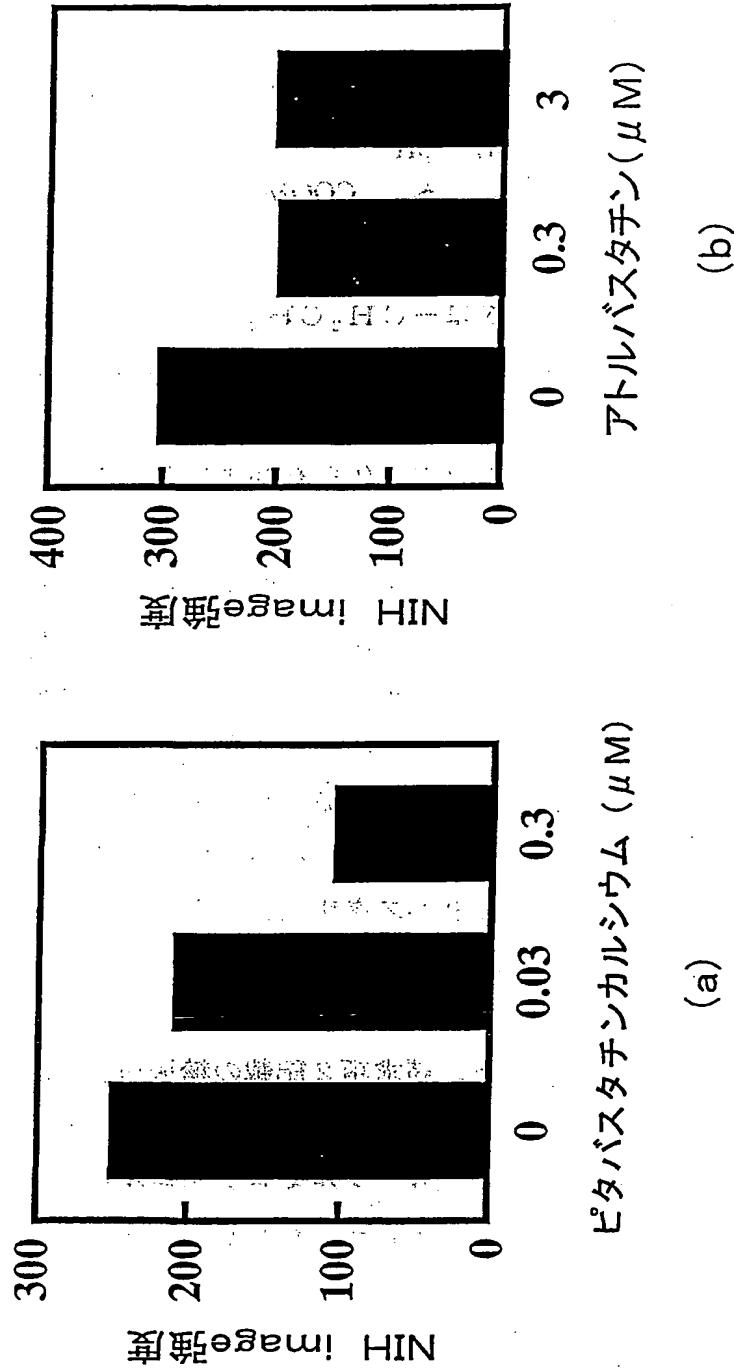


図1

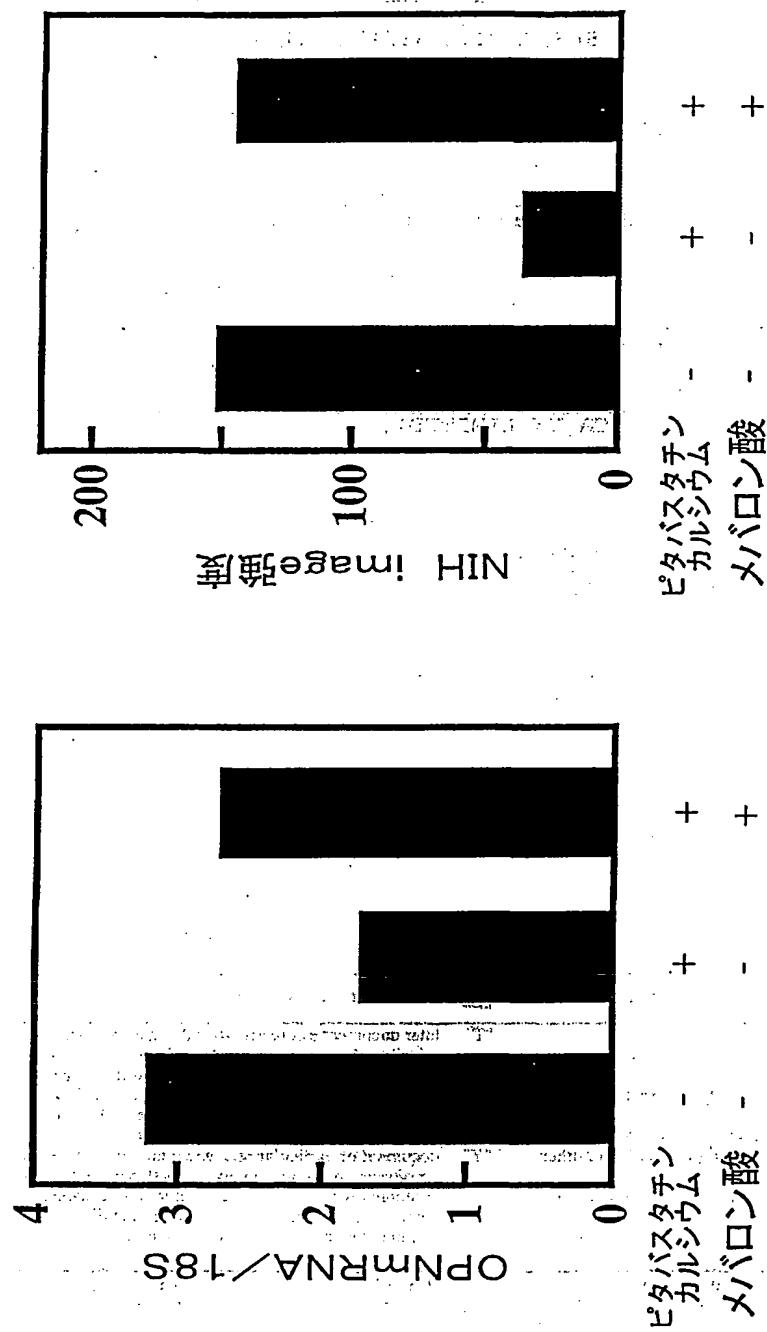


図2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08921

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/47, 31/40, 31/505, 31/22, 31/191, 31/192, A61P43/00, 13/12, 25/00, 27/02, 9/00, 3/10, C07D215/14, 239/42, 207/416

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/47, 31/40, 31/505, 31/22, 31/191, 31/192, C07D251/14, 239/42, 207/416

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/45818 A (ASTRAZENECA UK LIMITED), 10 August, 2000 (10.08.00), Claims 1,5 etc., & EP 1150678 A	1-3
Y	JP 4-282324 A (E.R. Squibb and Sons Inc.), 07 October, 1992 (07.10.92), Claims 1,3 etc., & US 4005113 A	4
Y	WO 00/05213 A (Nissan Chemical Industries, Ltd.), 03 February, 2000 (03.02.00), p. 3., etc., & EP 1099694 A	1-3 4

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
09 November, 2001 (09.11.01)Date of mailing of the international search report
04 December, 2001 (04.12.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08921

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See extra sheet.

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08921

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

Even though the statement in the description is examined, the structural scope of the term "organic group" as described in claim 1 cannot be clarified. Thus, the scope of the drug according to the present invention is unclear.

Accordingly, claim 1 and the description fail to satisfy the defined requirement to such an extent as enabling any meaningful international search.

In this international search report, prior art documents have been examined on the basis of the compounds particularly cited in the description.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/08921

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int cl' A61K31/47, 31/40, 31/505, 31/22, 31/191, 31/192, A61P43/00, 13/12, 25/00, 27/02, 9/00, 3/10, C07D215/14, 239/42, 207/416

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int cl' A61K31/47, 31/40, 31/505, 31/22, 31/191, 31/192, C07D251/14, 239/42, 207/416

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/45818 A (ASTRAZENECA UK LIMITED) 10. 8	1-3
Y	月. 2000 (10. 08. 00) クレーム1, 5他 & EP 1150678 A	4
X	JP 4-282324 A (イー・アール・スクイブ・アンド・	1-3
Y	サンズ・インコーポレイテッド) 7. 10月. 1992 (07. 1 0. 92) 請求項1, 3他 & US 4005113 A	4
Y	WO 00/05213 A (日産化学工業株式会社) 3. 2月. 2000 (03. 02. 00) p 3他 & EP 1099694 A	4

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す) :

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 09. 11. 01	国際調査報告の発送日 04.12.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内藤 伸一 4 P 8615 電話番号 03-3581-1101 内線 3492

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

別紙参照

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第I欄の2.について

請求の範囲1に記載された「有機基」なる文言は、明細書の記載を検討しても、いかなる構造のものまでを包含するものなのか明確であるとはいえないから、本願発明医薬の範囲を不明確にするものである。

したがって、請求の範囲1及び明細書は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない。

なお、この国際調査報告では、明細書に具体的に記載された化合物に基づいて先行技術文献調査を行った。